Münster i/W. 1934. No 24

Phil. Diss.

Chemie

Versuche mit Carboxylase-Modellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i.W.

vorgelegt von
Friedrich Hellrung
aus Düsseldorf

1934

Druck: Heinrich Pöppinghaus, o. H.-G., Bochum-Langendreer.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1933.

Dekan: Herr Prof. Dr. A. Eitel.

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. W. Langenbeck.

Korreferent: Herr Geh.-Reg.-Rat Prof. Dr. R. Schenck.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

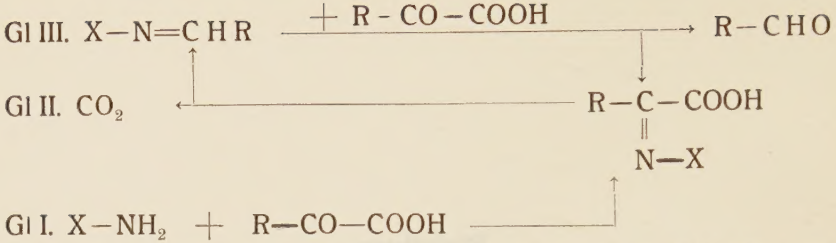
https://archive.org/details/IA41547226_0083

Einleitung.

Infolge der großen Zersetzlichkeit gereinigter Fermentlösungen ist es noch nicht gelungen, auf analytischem Wege einen Einblick in die Struktur der katalytisch wirksamen Gruppe der häminfreien Fermente zu erlangen. Eine noch wenig ausgenutzte Möglichkeit hierüber eine Vorstellung zu erhalten, ist die Auffindung von katalytischen Modellreaktionen bzw. die Synthese hierfür geeigneter, organischer Katalysatoren, deren Konstitution Rückschlüsse auf ein vergleichbares Ferment ermöglichen würde. Ein Beispiel für eine solche Modellreaktion ist die von W. Langenbeck aufgefundene katalytische Dekarboxylierung von Ketosäuren mittels primärer Amine, die ihr Analogon in der enzymatischen Spaltung von Brenztraubensäure durch das Ferment Carboxylase hat. Zwar sind speziell für die Dekarboxylierung von Brenztraubensäure verschiedene Methoden bekannt geworden, die sich von der Fermentreaktion dadurch unterscheiden, daß sie entweder hohe Energiemengen benötigen, wie z. B. die Zersetzung von Brenztraubensäure durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, oder daß die verwendeten Katalysatoren anorganische Stoffe sind und daher mit Fermenten nicht verglichen werden können, weil diese als organische Katalysatoren betrachtet werden müssen.

Die katalytische Wirkung der primären Amine wird durch Zwischenstoffe vermittelt, deren Bildung durch organische Hauptvalenzen im Sinne der Kékuléschen Theorie erfolgt. Die Katalyse wird eingeleitet durch eine Reaktion zwischen dem als Katalysator zugegebenen primären Amin und der α-Ketosäure, die zu einer α-Iminosäure führt. Diese spaltet leicht Kohlendioxyd ab. Das dadurch entstandene Aldehyd-imin setzt sich mit überschüssiger α-Ketosäure um zu Aldehyd und α-Iminosäure, die erneut die beschriebene Umsetzung erleidet. Dieser Kreisprozeß wird allgemein durch folgendes Schema dargestellt[1]):

1) W. Langenbeck u. R. Hutschenreuter, IV. Mittlg. Zeitschr. f. Anorg. Chem. 188, 1 (1930).



Die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Katalyse ist abhängig von der Konstitution des primären Amins. Die einfachsten aliphatischen oder aromatischen Amine, wie das Methylamin oder Anilin, sind nur sehr träge Katalysatoren, die erst oberhalb 100° wirksam sind.

Im Sinne der von W. Langenbeck aufgestellten Arbeitshypothese [2]) über die Existenz und das Zusammenwirken von aktiven und aktivierenden Gruppen im Ferment, besitzen die genannten Katalysatoren nur eine aktive Gruppe, deren Wirksamkeit durch Einführung bestimmter Substituenten gesteigert werden kann. Die Auswahl dieser aktivierenden Substituenten, ihre wirksamste Kombination und die Auffindung der günstigsten Stellung im Molekül kann nur rein empirisch erfolgen. W. Langenbeck entwickelte hierfür eine Arbeitsweise [2]), die er als systematische Aktivierung bezeichnete. Von einem Grundstoff ausgehend wird nach Einführung verschiedener Substituenten das aktivste mono-substituierte Derivat ausgesucht. In diese Körper werden wieder eine Reihe Substituenten eingeführt, und dann der hierbei erhaltene aktivste Stoff als Ausgangssubstanz einer neuen Substitutionsreihe gewählt.

Auf diese Weise konnte eine Reihenfolge von Katalysatoren mit steigender Aktivität gefunden werden: Methylamin → Glyzin → Phenyl-amino-essigsäure → Amino-3-oxindol → 6,7 — Benzo-amino-3- oxindol.

Die Aktivität in dieser Reihe nimmt um das 2000 fache zu. Es konnte daher die Reaktionstemperatur der Katalyse von 137° auf 37° gesenkt werden.

Die katalytische Wirkung wurde gemessen an der Spaltung von Phenylglyoxylsäure in Phenol-Lösung. Aber auch Brenztraubensäure wird in wässriger Lösung von 6,7-Benzo-amino-3-oxindol unter geeigneten Versuchsbedingungen dekarboxyliert [3]). Ein organischer Katalysator kann aber nach der Definition von W. Langenbeck erst dann als Fermentmodell be-

2) W. Langenbeck, Ergebnisse der Enzymforschung (1933).
3) W. Langenbeck, l. c.

zeichnet werden, wenn auch sein Reaktionsmechanismus d. h. seine Kinetik mit der des vergleichbaren Fermentes übereinstimmt. Denn es ist denkbar, daß bei Gleichheit von Substrat und Reaktionsprodukten die Enzymreaktion einen anderen Weg nimmt als die Katalyse. Der Nachweis der völligen Fermentähnlichkeit des aktivsten Katalysators wird in dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit geführt, indem seine von mir untersuchte Reaktionskinetik verglichen wird mit der Kinetik der Carboxylase.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird versucht, durch Auffindung neuer Derivate des 3-Amino-oxindols die Aktivität der Katalysatoren zu verbessern. Eine Steigerung der Aktivität konnte erreicht werden durch die Darstellung des Acenaphten-3-amino-oxindols.

I.) Reaktionskinetische Messungen.

Eine der wichtigsten Aufgaben der Fermentchemie ist die Untersuchung der Enzymkinetik, weil hierdurch der verschiedene Ablauf der einzelnen Enzymreaktionen am deutlichsten erkannt werden kann. Auch die Kinetik der Carboxylase ist mehrfach beobachtet worden. E. Hägglund und T. Rosenqvist[4]) fanden, daß die Spaltung der Brenztraubensäure eine Reaktion von nullter Ordnung ist und daß die Kohlensäureentwicklung d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit wenig abhängt von der Konzentration des Substrates. Allerdings gilt das letztere nur innerhalb gewisser Grenzen. In größerer Verdünnung verläuft die Spaltung mit geringerer Geschwindigkeit. Für die Beurteilung der Reaktion konnten nur die Meßergebnisse der ersten 15 Minuten ausgewertet werden, da sich im weiteren Verlauf Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit einstellten, die E. Hägglund auf die Verschiebung des p_H-Wertes während der Spaltung zurückführte. K. Wetzel[5]), der ebenfalls die Reaktionskinetik der Carboxylase untersuchte, konnte nachweisen, daß die Hemmung zum größeren Teil verursacht wurde durch die steigende Aldehydkonzentration.

Die gleichen Ergebnisse zeigten entsprechende Versuche mit 6,7-Benzo-3-amino-oxindol als Katalysator. Es wurde die Spaltung von Phenylglyoxylsäure in Phenol-Lösung innerhalb 4 Versuchsansätzen gemessen, deren Verdünnung jeweils von Versuch zu Versuch verdoppelt wurde. Die Messungen erfolgten nach der Methode von W. Langenbeck und R. Hutschen-

4) Bioch. Z. 181, 300. (1927).

5) Ztschr. wiss. Biol. Abt. E., Planta Arch. wiss. Botanik, 15, 697, (1932).

reuter[6]) durch gewichtsanalytische Bestimmung des entwikkelten Kohlendioxyds. Als Reaktionsgefäß diente ein Rundkolben mit langem Hals, der sich in einem Thermostaten von 70° befand. Er war verbunden mit einer gekühlten Glasspirale, die mitgerissene Dämpfe kondensieren sollte. An diese schloß sich an ein Chlorkalziumrohr, ein Dreiweghahn und endlich an dessen freien Enden je zwei U-Rohre, die in üblicher Weise mit Natronkalk und Chlorkalzium gefüllt waren. Die Dekarboxylierung der Phenylglyoxylsäure ging in reinem, sauerstoffreiem Stickstoffstrom vor sich. Nachdem die Luft aus der Apparatur verdrängt und Temperaturausgleich eingetreten war, wurde der Katalysator, in einem Wachshütchen abgewogen, zu der Substratlösung gegeben. Die CO_2-Adsorption erfolgte innerhalb der angegebenen Zeiten in je zwei der Adsorptionsgefäße. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in folgender Tabelle aufgezeichnet.

Tabelle 1

Min.	I CO_2 in mg.		II CO_2 in mg.		III CO_2 in mg.		IV CO_2 in mg.	
15	16,0		12,4		12,2		6,8	
		18,0		16,0		14,6		10,4
30	34,0		28,4		26,6		17,2	
		24,6	—			26,6		30,6
90	58,6				63,2		48,6	
		7,0				15,6		20,2
150	65,6				78,8		68,8	
		4,0				7,0		8,9
210	69,6				85,8		77,7	
		2,2				2,8		5,8
270	71,8				88,6		83,5	

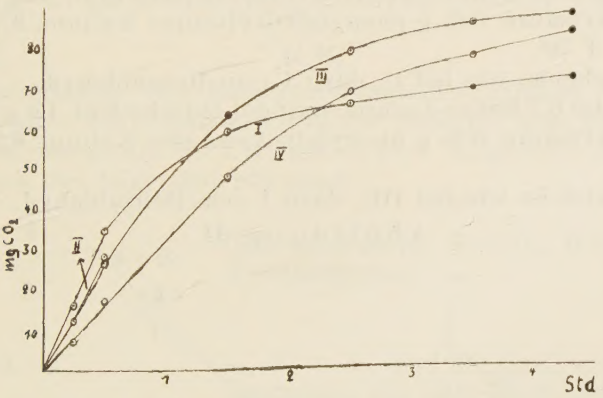
I) 10^{-5} Mol 6,7-Benzo-3-amino-oxindol-chlorhydrat 0,5 g Phenylglyoxylsäure, 0,25 g phenylglyoxylsaures Kalium, 4,5g Phenol, T 70°.
II) Das gleiche mit 9,5 g Phenol,
III) „ „ „ 19,5 „ „
IV) „ „ „ 39,5 „ „

Bei diesen Modellversuchen können gleichfalls nur die Ergebnisse der ersten kurzen Zeitabschnitte für die Beurteilung des Reaktionsverlaufes herangezogen werden, da mit der zunehmenden Aldehydkonzentration eine starke Hemmung des Kata-

6) l. c.

lysators verbunden ist. Aus der Tab. 1 ist ersichtlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit, die proportional ist dem entwickelten Kohlendioxyd, wenig abhängt von der Konzentration des Substrates. Nur in Versuch IV, bei der größten Verdünnung, ist eine geringere Anfangsgeschwindigkeit zu bemerken. Die Dekarboxylierung der Phenylglyoxylsäure verläuft also mit der Geschwindigkeit einer mono-molekularen Reaktion. Diese Erkenntnis, auf das Reaktionsschema (s. Einleitung) angewendet, ergibt, daß eine mono-molekulare Reaktion die Geschwindigkeit der Katalyse bestimmt. Die einzige auftretende Reaktion dieser Art ist die Abspaltung von CO_2 aus der Iminosäure unter Bildung von Imin-aldehyd (Gl. II). Wenn also die Geschwindigkeit der Katalyse beschleunigt wird durch Verwendung eines aktivierten Katalysators, dann ist dies immer auf eine erhöhte Unbeständigkeit der Iminosäure zurückzuführen. Die Konzentration dieser Säure wird durch das Zusammenwirken von Gleichung II und III konstant gehalten. Die Dekarboxylierung müßte daher mit konstanter Geschwindigkeit verlaufen, d. h. die Katalyse sollte eine Reaktion von nullter Ordnung sein, wie es für die Wirkung der Karboxylase gefunden worden ist. Um diese Folgerung aus dem Reaktionsschema zu prüfen, wurden die Werte der Tabelle 1 in Abb. 1 graphisch aufgetragen.

Abbildung I.



Die Geschwindigkeitskurven verlaufen, übereinstimmend mit der theoretischen Forderung, im ersten Stadium der Reaktion annähernd geradlinig. Besonders deutlich trifft dieses zu für Kurve IV. Nach 4½ stündiger Versuchsdauer ist der Katalysator fast vollkommen inaktiviert. Bemerkenswert ist, daß in diesem Zeitpunkt angenähert gleiche Mole Phenylglyoxylsäure umge-

setzt worden sind.

Auch die Wirkung der Karboxylase geht nach einiger Zeit stark zurück. K. Wetzel[7]) konnte den Nachweis erbringen, daß die Geschwindigkeit der Brenztraubensäurespaltung von einer bestimmten Aldehydkonzentration an stark abnahm. W. Langenbeck beobachtete, daß die Hemmung der Karboxylase durch zugesetzten Acetaldehyd zum Teil substrat-abhängig ist.

Diese Substratabhängigkeit der Hemmung durch zugefügten Aldehyd zeigt ebenfalls die Modellreaktion. Es wurde die Hemmung durch gleichbleibende Konzentration von Benzaldehyd bei verschiedenen Konzentrationen des Substrats gemessen. Die Versuchsanordnung hierfür war die gleiche wie die schon beschriebene. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle II und in Abbildung II enthalten.

Tabelle II

Min.	I CO_2 in mg.	II CO_2 in mg.	III CO_2 in mg.	IV CO_2 in mg.
15	12,4	6,6	12,2	8,0
30	28,4	9,1	31,2	13,6

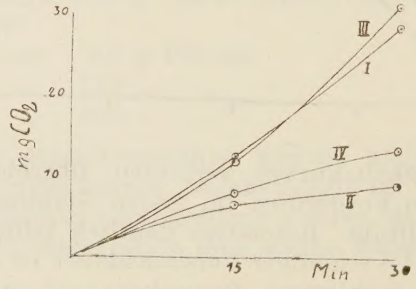
I) 10^{-5} Mol 6,7-Benzo-3-amino-oxindol-chlorhydrat, 0,5 g Phenylglyoxylsäure, 0,25 g phenylglyoxylsaures Kalium, 9,5 g Phenol; T 70°.

II) Das gleiche wie bei I), dazu 1 ccm Benzaldehyd.

III) 10 Mol 6,7-Benzo-3-amino-oxindol-chlorhydrat, 1,0 g Phenylglyoxylsäure, 0,25 g phenylglyoxylsaures Kalium, 9,5 g Phenol.

IV) Das gleiche wie bei III), dazu 1 ccm Benzaldehyd.

Abbildung II



7) l. c.

Die auftretende Hemmung wird am zweckmäßigsten ausgedrückt durch den Hemmungskoeffizienten h:

$$h = \frac{v_0 - v}{v_0}, \quad \text{Gl. IV.}$$

wo v_0 die Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit von Benzaldehyd bedeutet, v die Geschwindigkeit in Gegenwart von Benzaldehyd.

Der Hemmungskoeffizient bei kleiner Substratkonzentration (Versuch I und II) beträgt für 30 Min. Versuchsdauer 0,68. Durch Verdopplung der Substratkonzentration fällt er auf 0,56.

Beobachtet man die Hemmungskoeffizienten der einzelnen gemessenen Zeitabschnitte, so ergibt sich, daß die Hemmung durch Benzaldehyd von der Zeit abhängig ist. Die Hemmungskoeffizienten der Versuche I und II steigen von 0,47 auf 0,85. In den Versuchen III und IV nehmen diese zu von 0,34 auf 0,71. Auffallend ist, daß im zweiten Fall ihre Zunahme prozentual stärker ist (109% gegenüber 81%) als in den Versuchen I und II mit halber Substratkonzentration. Die hemmende Wirkung des Benzaldehyds ist also zum Teil reversibel, zu ihrem größten Teil aber irreversibel. Die reversible Hemmung kann zwanglos erklärt werden aus der Einwirkung des Benzaldehyds auf das Gleichgewicht:

$$R_1-C.H \;\|\; N.R_2 \;+\; R_1.CO.COOH \;\rightleftharpoons\; R_1.C.COOH \;|\; N.R_2 \;\rightleftharpoons\; R_1.C.COOH \;+\; R_1.C\!\begin{matrix}H\\O\end{matrix}$$

Die Abhängigkeit der Katalysatorengeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates und des Aldehyds geht hervor aus einer Gleichung, die W. Langenbeck aufgestellt hat unter Benutzung des folgenden Schemas:

$$AB + X \underset{k_1'}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AX + B$$

(AB=Ketosäure, A=CO_2, B=Aldehyd, X=Katalysator.

$$AX \xrightarrow[k_2]{} A + X$$

k_1, k_1' u. k_2 sind die Geschwindigkeitskonstanten der betr. Reaktion.)

Daraus läßt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit v ableiten: Gl. V.

$$v = \frac{k_2 \cdot [AB \cdot [X']}{\frac{k_2}{k_1} + \frac{k_1'}{k_1}[B] + [AB]}$$

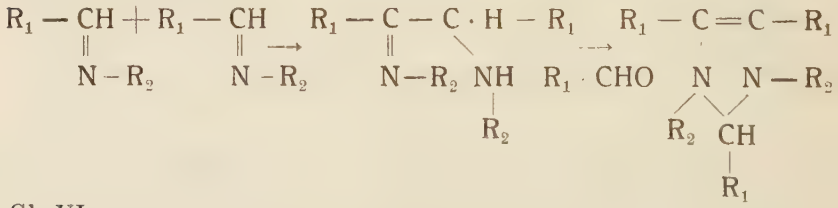
([X'] = Gesamtkonzentration des Katalysators.)

Die Voraussetzungen dieser Gleichung sind:
1. die Zwischenstoffe sind durch Hauptvalenzen gebunden.
2. sämtliche Teilreaktionen verlaufen mit meßbarer Geschwindigkeit.

Nach Gleichung V muß die Reaktionsgeschwindigkeit abnehmen mit steigender Aldehydkonzentration [B]. Für den Hemmungskoeffizienten h ergibt sich unter Benutzung der Gleichungen IV und V:

$$h = \frac{k_1 \cdot [B]}{k_2 + k'_1 \cdot [B] + k_1 \cdot [AB]}$$

Diese Gleichung läßt erkennen, daß der Hemmungskoeffizient verkleinert wird durch Vergrößerung der Substratkonzentration [AB], wie es auch aus den Versuchsergebnissen gefolgert werden konnte. Die irreversible Hemmung wird verursacht durch die Inaktivierung des Katalysators. Ihr Reaktionsverlauf ist von R. Jüttemann[8]) näher untersucht worden für Anilin, dessen katalytische Wirksamkeit nur sehr gering war, da es in kurzer Zeit durch eine Nebenreaktion verbraucht wurde. Es kondensierte sich der eigentliche Katalysator, Benzalanilin, mit Benzaldehyd zu Penta-phenyl-dihydro-imidazol. Diese Inaktivierungsreaktion formulierte R. Jüttemann allgemein durch folgendes Schema:



Gl. VI.

Die Geschwindigkeit dieser Reaktionsfolge ist also unabhängig von der Substratkonzentration und wird nur beeinflußt durch die Konzentration des Katalysators und des Benzaldehyds. Hierin liegt auch eine Erklärung für den verschiedenen Endverlauf der in Tab. I wiedergegebenen Messungen. Da die in Gleichung VI enthaltenen Reaktionen von II. Ordnung sind, muß die Inaktivierungsgeschwindigkeit abnehmen mit steigender Verdünnung. Daher setzt die Störung der Dekarboxylierung in den einzelnen Versuchen, wie sich aus dem Verlauf der Kurven (Abb. I) erkennen läßt, in ganz verschiedenen Zeitpunkten mit verschiedener Stärke ein.

8) Inaug. Diss., Münster i/W. 1933.

In der Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit v (Gl. V) kann der Quotient k_2/k_1 aus experimentellen Daten ermittelt werden, analog einer Methode von Michaelis und Menten[9]).

Wird nur die Anfangsgeschwindigkeit der Katalyse betrachtet, dann ist [B] = 0 und es folgt:

$$v_{Anf.} = \frac{k_2\,[X']\,[AB]}{\frac{k_2}{k_1} + [AB]} \qquad \text{Gl. VII.}$$

Die Werte von $v_{Anf.}$ streben einem Maximum zu, wenn die Substratkonzentration [AB] gesteigert wird. Ist [AB] so groß, daß k_2/k_1 vernachlässigt werden kann, dann ist:

$$v_{max} = k_2 \cdot [X'] \qquad \text{Gl. VIII.}$$

Dies ist die größte Anfangsgeschwindigkeit, mit der die Katalyse bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Katalysator einsetzen kann. Für $[AB] = k_2/k_1$ ergibt sich

$$v = \frac{k_2\,[X']}{2} = \frac{v_{max}}{2} \qquad \text{Gl. IX.}$$

Wenn also die Katalyse mit der halben Anfangsgeschwindigkeit verläuft, dann ist $k_2/k_1 = [AB]$. Der Quotient k_2/k_1 wird bestimmt aus der Aktivitätsp_s-Kurve, die man erhält, wenn man auf der Abzisse — log [AB] (p) aufträgt und auf der Ordinate die dazugehörigen Anfangsgeschwindigkeiten. Wird die maximale Geschwindigkeit gleich 1 gesetzt, dann liefert die Ordinate ½ nach Gl. IX die Abzisse — log k_2/k_1. Die Aktivitäts(p_s) Kurve hat im Idealfall die Gestalt einer Dissoziationsrestkurve. Diese theoretische Forderung ist nicht für alle Fermente erfüllt. So fanden E. Bamann und M. Schmeller[10]), daß die Aktivitäts-p_s-Kurven von Lipasen verschiedener Herkunft sich keinem Grenzwert nähern, sondern in ihrem Verlauf Maxima aufweisen.

Die für die Aufstellung der Aktivitäts p^s-Kurve notwendigen Messungen wurden im Warburg-Apparat bei 37° Badtemperatur vorgenommen. Als Katalysator diente 6,7-Benzo-3-aminooxindol-chlorhydrat, dessen Wirksamkeit bei verschiedenen

9) Bioch. Z. 49, 333 (1913).
10) Ztschr. f. physiol. Chemie, 183, 149 (1929).

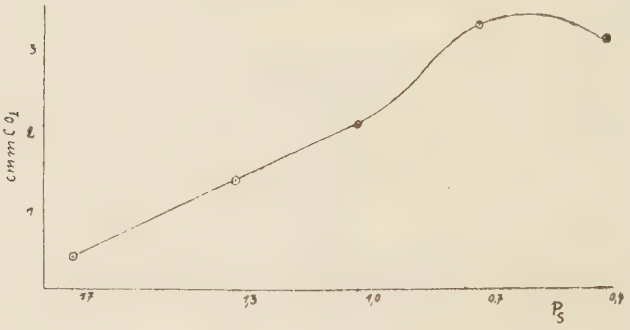
Substratkonzentrationen gemessen worden ist. In Tab. III und Abb. III sind die Ergebnisse dieser Messungen wiedergegeben

Tabelle III

Konz. des Substrates	I 0,373	II 0,187	III 0,0935	IV 0,0468	V 0,0187
CO_2 in cmm nach 5 Min.	3,15	3,29	2,06	1,35	0,39

I) 2.10^{-6} Mol 6,7 Benzo-3-amino-oxindol-chlorhydrat, 2 ccm Stammlösung (0,5 g Phenylglyoxylsäure + 0,1 g phenylglyoxylsaures Kalium + 9,5 g Phenol-Kresol-Gemisch)
II) 2.10^{-6} Mol Katalysator + 1 ccm Stammlösung + 1 ccm Phenol-Kresol-Gemisch.
III) 2.10^{-6} Mol Katalysator + 0,5 ccm Stammlösung + 1,5 ccm Phenol-Kresol-Gemisch
IV) 2.10^{-6} Mol Katalysator + 0,25 ccm Stammlösung + 1,75 ccm Phenol-Kresol-Gemisch
V) 2.10^{-6} Mol Katalysator + 0,1 ccm Stammlösung + 1,9 ccm Phenol-Kresol-Gemisch

Abbildung III



Die Aktivitäts p_s-Kurve strebt also keinem Grenzwert zu, sondern durchläuft ein Maximum. Dieses trifft aber auch, wie W. Langenbeck und Mitarbeiter [11]) fanden, für die Carboxylase zu, deren Aktivitäts-p_s-Kurve ebenfalls ein Maximum besitzt.

Aus den Versuchswerten der Tabelle III lassen sich die Konstanten der Gleichung VII folgendermaßen berechnen:

Die maximale Anfangsgeschwindigkeit, gemessen in cmm

11) W. Langenbeck, R. Jüttemann, O. Schäfer und H. Wrede: Ztschr. f. physiol. Chemie, i. Dr. (1933).

CO_2, beträgt : 3,291 cmm. Die Ordinate $\frac{3,291}{2}$ liefert die Abzisse: $p_s = 1,185$.

Nach den vorstehenden Ausführungen ist $\cdot \log k_2/k_1 = 1,185$. Daraus ergibt sich: $k_2/k_1 = 0,06531$.

Die Konstante k_2 kann aus der Gleichung der maximalen Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden, da die Konzentration des Katalysators bekannt ist.

$$\text{Es ist: } k_2 = \frac{v_{max}}{[X']} \qquad \text{Gl. X.}$$

V_{max} muß hierin ausgedrückt werden durch die Änderung der Konzentration der Phenylglyoxylsäure in der Zeiteinheit. In 5 Minuten wurden 3,291 cmm CO_2 entwickelt, bezw. $\frac{3,29}{24,4 \cdot 10^6}$ Mol Phenylglyoxylsäure gespalten. Für die Änderung der Konzentration an Phenylglyoxlsäure in 1 Minute ergibt sich:

$$\triangle c = \frac{3,29 \cdot 10^{-5}}{22,4 \cdot 10^{-6} \cdot 2 \cdot 5} = 1,469 \cdot 10^{-5}/\text{Min.}:$$

Angewendet wurden 2.10^{-6} Mol Katalysator.

$$\text{Also ist } [X'] = \frac{2.10^{-6} \cdot 10_2}{2} = 10^{-3}$$

Diese Werte in Gleichung X eingesetzt, ergibt:

$$k_2 = \frac{1,469 \cdot 10^{-5}}{10^{-3}} = 0,015$$

$$\text{Aus } k_2/k_1 = 6,531 \cdot 10^{-2}, \text{ folgt: } k_1 = \frac{1,469 \cdot 10^{-5}}{6,531 \cdot 10^{-2}}$$

$$k_1 = 0,22$$

Die hier berechneten Werte für k_1 und k_2 können natürlich keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben, aber sie gestatten doch einen Einblick in die Größenordnung der Konstanten.

Ein charakteristischer Unterschied zwischen Fermenten und anorganischen Katalysatoren besteht in ihrer Spezeficität. Es können z. B. mit Palladium oder mit Platin die verschiedensten Stoffe hydriert werden. Die Fermente dagegen wirken nur auf Verbindungen gleicher Konstitution ein; es spaltet die Carboxylase nur α-Ketosäuren. Ist aber der Karbonylgruppe ein quarternäres C-Atom benachbart, wie z. B. in der Trimethylbrenztraubensäure, dann wird diese Säure von der Carboxylase nach Neuberg[12]) nicht angegriffen. Auch die Fermentmo-

12) C. Neuberg u. F. Weimann, Bioch. Z. 200, 473 (1928).

delle zeigen diese strukturchemische Spezificität der Carboxylase. 6,7-Benzo-3-amino-oxindol reagiert nicht mit Trimethylbrenztraubensäure. Nach W. Langenbeck wird diese Reaktionsträgheit der Trimethylbrenztraubensäure am besten als sterische Hinderung zu deuten sein, indem das quarternäre C-Atom die Reaktionsfähigkeit der Carbonylgruppe herabsetzt, ähnlich wie es im Pinakolin der Fall ist, das mit Phenylhydrazin viel langsamer reagiert als Aceton.

II. Darstellung von Carboxylase-Modellen.

a) Theoretischer Teil.

Den größten Erfolg hatte die systematische Aktivierung zu verzeichnen, als durch Einführung einer Aminogruppe in den Phenylkern der Phenyl-amino-essigsäure die Aktivität des erhaltenen Katalysators, des 3-Amino-oxindols, um das 20 fache gesteigert wurde. Bei der Darstellung verschiedener Derivate des 3-Amino-oxindols fand R. Jüttemann[13]), daß 6,7-Benzo-3-amino-oxindol, das aus der aktiven Grundsubstanz durch Kondensation eines Benzolringes abgeleitet werden kann, die größte Aktivität besaß.

Meine Aufgabe war es zu untersuchen, welche Wirkung ein Pyridinkern an Stelle des kondensierten Benzolringes auf die Aktivität des 3-Amino-oxindols ausübt, und ob durch nochmalige Ringerweiterung über das 6,7-Benzo-3-amino-oxindol hinaus eine weitere Aktivierung möglich ist. Es brauchten aber nur solche Derivate berücksichtigt werden, die sich aus α-Aminen darstellen ließen, da das 4,5-Benzo-3-amino-oxindol, das aus β-Naphtylamin erhalten wurde, im Gegensatz zu seinen Isomeren katalytisch sehr unwirksam war.

Sämtliche in Frage kommende Derivate des Amino-oxindols und der zugehörigen Isatine waren unbekannt. Alle Amino-oxindole wurden aus Isatoximen entweder durch katalytische Hydrierung oder durch Reduktion mit Zinnchlorür und Salzsäure erhalten. Die Isatoxime waren leicht zugänglich durch Oximierung von Isatimen nach einer Methode von W. Borsche und W. Sanders[14]). Die Isatine wurden aus α-Aminen dargestellt entweder durch Kondensation mit Oxalylchlorid nach Angaben von R. Stollé[15]) oder durch Kondensation mit Mesoxalsäureester bzw. dessen Hydrat nach J. Martinet[16])

13) l. c.

14) B. 47, 2817, 2823, (1914).

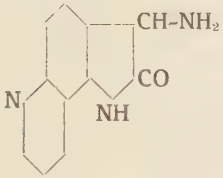
15) J. pr. 128, 23 (1930).

16) Ann. Chim. (9) 11, 15, 85 (1919).

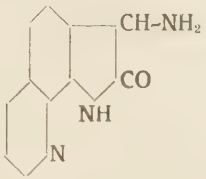
Nach dem ersten Verfahren können nur N-substituierte Isatine erhalten werden, da die genannte Kondensation allein mit sekundären Aminen gelingt. Um den Einfluß dieser Substitution kennenzulernen, wurde das N-Phenyl-isatin hergestellt. Das entsprechende N-Phenyl-amino-oxindol war um ça 20% weniger aktiv als die Grundsubstanz.

Von den möglichen Isomeren, die durch Kondensation eines Pyridinkerns an das 3-Amino-oxindol abgeleitet werden können, wurden das 6,7-(2',3'-Pyridino)-3-amino-oxindol (I) und das 7,6-(2',3'-Pyridino)-3-amino-oxindol (II) untersucht.

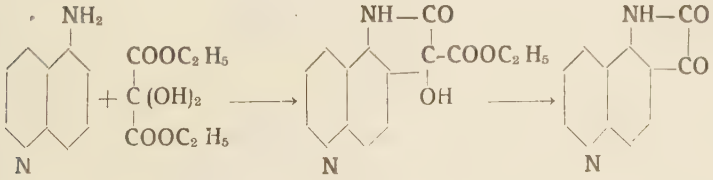
I.



II.



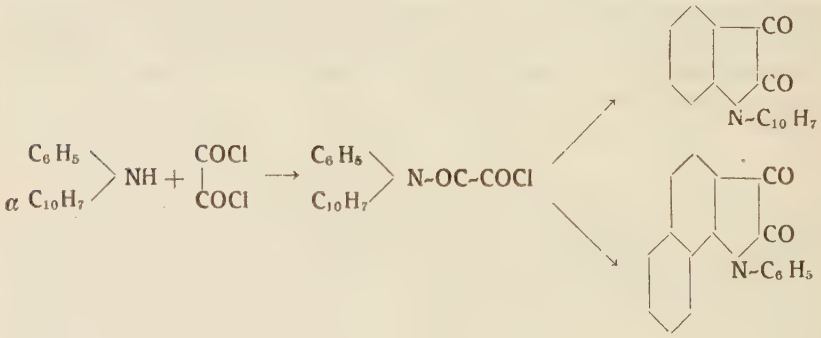
Die Darstellung der entsprechenden Isatine machte zuerst größere Schwierigkeiten. Nach längeren Versuchen gelang sie durch Kondensation von 5-Aminochinolin bzw. 8-Aminochinolin mit Dioxy-malonsäure-diäthylester. Diese Kondensation hat bei Verwendung von 5-Aminochinolin folgenden Verlauf:



Das gleiche gilt für 8-Aminochinolin als Ausgangssubstanz.

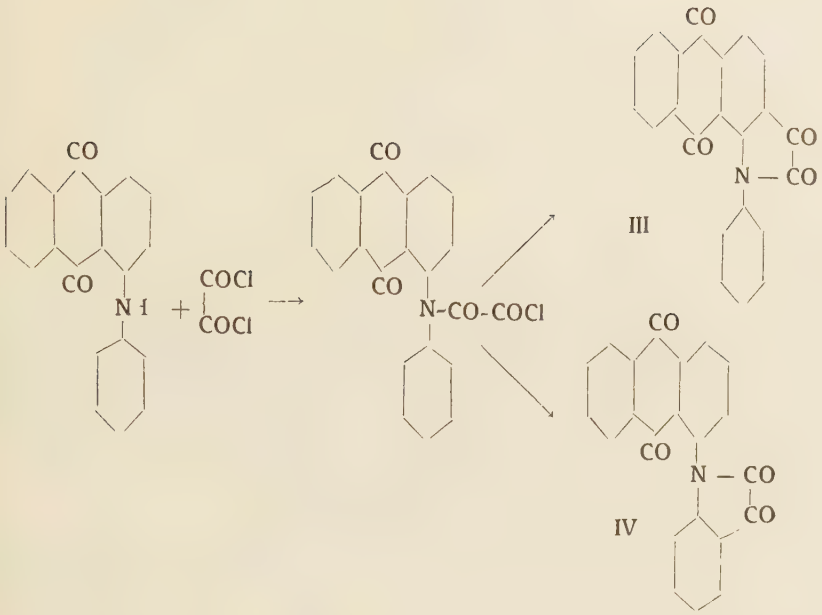
Die aus den Isatinen erhältlichen Amino-oxindole (I und II) waren katalytisch sehr unwirksam. Ihre Aktivität betrug bei 37° nur ¼ des Wertes von 6,7-Benzo-amino-oxindol, das bei 70° doppelt so aktiv ist wie 3-Amino-oxindol. Daraus kann geschlossen werden, daß der Pyridinkern nur hemmend auf die aktive Gruppe des 3-Amino-oxindols einwirkt.

Da diese Aktivierungsversuche keinen Erfolg hatten, wurde versucht, die Zahl der C-Ringe in 6,7-Benzo-amino-oxindol zu vergrößern. Zuerst sollte ein Derivat des Amino-oxindols dargestellt werden, das aus α-Amino-anthrachinon oder einem Derivat desselben erhältlich war. Die Kondensation von α-Amino-anthrachinon mit Mesoxalsäureester bzw. dessen Hydrat mißlang, da sich immer, wie auch die Reaktionsbedingungen geändert werden mochten, nur lockere Anlagerungsprodukte bildeten, die beim Umkristallisieren zerfielen. Daher wurde für die Darstellung des benötigten Isatins die Methode von R. Stollé angewendet und Phenyl-α-amino-anthrachinon mit Oxalylchlorid kondensiert. Die Reaktionsbedingungen hierfür sind schon in einer Patentschrift der J. G.-Farbenindustrie [17]) beschrieben. Die Konstitution des Kondensationsproduktes ist aber nicht näher untersucht worden, da es nur Zwischenprodukt einer Farbstoffsynthese war. Nach R. Stollé sind bei der Kondensation von gemischten, sekundären Arylaminen mit Oxalylchlorid zwei Reaktionsmöglichkeiten vorhanden. Ausgehend vom α-Phenyl-naphtylamin konnten je nach den Reaktionsbedingungen 2 verschiedene Isatine erhalten werden [18]), deren Bildung R. Stollé durch folgendes Reaktionsschema erklärte:

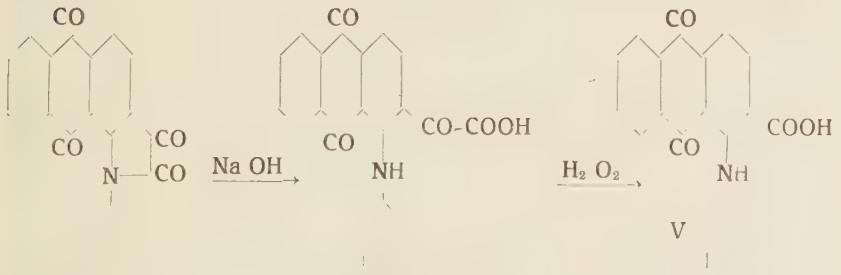


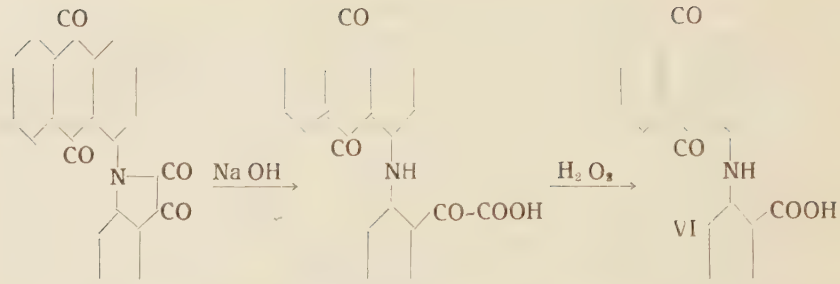
Die gleichen Reaktionsmöglichkeiten bestehen auch für die Kondensation von α-Phenyl-amino-anthrachinon mit Oxalylchlorid:

17) DRP. Nr. 282 490; C 1915, I, 583.
18) J. pr. 105, 144 (1923).



Welches Isatin sich gebildet hat, läßt sich nach R. S t o l l é leicht entscheiden, wenn man die Kondensationprodukte mit verdünnter Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd abbaut zu den entsprechenden Karbonsäuren. Die Anwendung dieser Methode auf die Isatine III und IV läßt folgenden Reaktionsverlauf zu:





Die hierbei entstehenden Säuren sind bekannt. Da die α-Phenyl-amino-anthrachinon-2-carbonsäure (V) bei 284 °[19]) und die Anthrachinonyl-anthranilsäure (VI) bei 282 °[20]) schmilzt, mußte eine dieser Verbindungen für die Konstitutionsaufklärung dargestellt werden. Am leichtesten zugänglich war die Anthrachinonyl-anthranilsäure, die nach einer Vorschrift von F. Ullmann und P. Ochsner erhalten wurde.

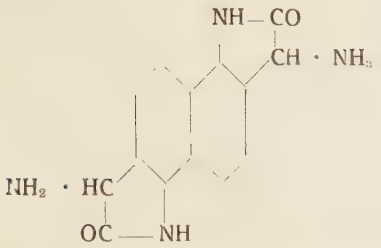
Das Abbauprodukt des zu untersuchenden Isatins hatte einen Schmelzpunkt von 281 °. Die Mischschmelzpunktsprobe mit Anthrachinonyl-anthranilsäure ergab keine Erniedrigung des Schmelzpunktes. Damit war erwiesen, daß anstatt des gewünschten Anthrachinonisatins ein N-Anthrachinonyl-isatin entstanden war. Das hieraus erhältliche N-Anthrachinonyl-3-amino-oxindol hatte die gleiche Aktivität wie das N-Phenyl-3-amino-oxindol.

Die nun folgende Darstellung eines Katalysators mit vergrößertem Molekül, zu der das α-Aminoacenaphten als Ausgangssubstanz gewählt wurde, war von besserem Erfolg begleitet. Die Kondensation mit Mesoxalsäureester verlief überaus glatt und ergab in allen Zwischenstufen bis zum Amino-oxindol-chlorhydrat sehr gut kristallisierende Substanzen. Die Aktivität des Acenaphten-3-amino-oxindols, gemessen bei 37 °, lag um ca. 25% höher als die des 6,7-Benzo-3-amino-oxindols. Es ist also wahrscheinlich, daß eine weitere Vergrößerung des Katalysatormoleküls durch Anfügung neuer C-Ringe die Aktivität des Amino-oxindols erhöht.

Eine andere Möglichkeit aktive Katalysatoren zu erhalten, wäre die Vermehrung der aktiven Gruppen im Molekül. Eine solche könnte verwirklicht werden durch die Darstellung des Naphto-di-amino-di-oxindols:

---

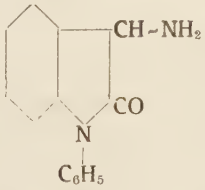
19) E. P. 321 916, C. 1930, I, 3241.
20) F. Ullmann u. P. Ochsner, An. 381, 4 (1911).



Das entsprechende Naphto-di-isatin wurde nach einer Vorschrift von J. Martinet[21]) erhalten. Die Oximierung dieses Di-isatins war noch möglich. Die Reduktion mit Zinnchlorür und Salzsäure oder die katalytische Hydrierung zum Di-amino-di-oxindol versagte vollständig, da das Oxim außerordentlich schwer löslich in organischen Lösungsmitteln war.

b) Experimenteller Teil.

1) N-Phenyl-3-amino-oxindol.



Das N-Phenyl-isatin ließ sich darstellen nach Angaben von R. Stollé[22]) aus Diphenylamin und Oxalylchlorid.

2,2 g N-Phenyl-isatin wurden in 40 ccm Eisessig gelöst und mit 1,4 g Hydroxylaminchlorhydrat und 7,0 g Natriumacetat 1 Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Durch Zusatz von Wasser fiel das Oxim aus. Ausbeute: 2 g.

Aus Eisessig umkristallisiert, hatten die gelben Kristalle einen Schmelzpunkt von 221°.

Zur Reduktion wurden 1,2 g N-Phenyl-isatin-oxim in 20 ccm Eisessig gelöst, uit 4,5 g Zinn-2-chlorid und 9 ccm konz. Salzsäure versetzt und etwa 1 Stunde auf dem Wasserbad erhitzt, bis die Farbe der Lösung in hellgelb umschlug. Nach Verdünnen der Lösung mit Wasser auf ca. 250 ccm fällte ich das Zinn mit Schwefelwasserstoff aus. Die vom Zinnsulfid-Niederschlag befreite Lösung wurde im Vakuum unter CO_2-Schutz zur Trockne gedampft. Aus dem im Wasser ge-

21) Bl. 31, 435 (1922).
22) l. c.

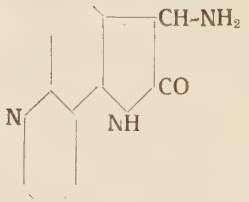
lösten Rückstand konnte das N-Phenyl-3-amino-oxindol als Pikrat durch Zugabe einer Lösung von Natriumpikrat und Pikrinsäure in Form hellgelber Nadeln erhalten werden. Diese hatten keinen Schmelzpunkt.

6,53 mg Substanz: 12,66 mg CO_2, 1,85 mg H_2O. —
5,33 mg Substanz: 0,705 ccm N_2 (20°, 770 mm)
C_{20} H_{15} O_8 N_5: Ber. C. 52, 96 H 3, 35 N 15, 45
Gef. C 52, 87 H 3, 17 N 15, 31.

A. W. $_{70}$: 5,3

Der Aktivitäts-Wert (A. W.) gibt die Anzahl Mole Phenylglyoxylsäure an, die durch 1 Mol Katalysator in den ersten 5 Minuten gespalten wird. Der Index zeigt die Reaktionstemperatur an. Die Aktivität der übrigen dargestellten Katalysatoren wird ebenfalls durch den A. W. bezeichnet.

2) 6, 7-(2', 3'-Pyridino)-3-amino-oxindol.



Ausgangsmaterial war 5-Nitro-chinolin, das durch Nitrierung von Chinolin gleichzeitig mit 8-Nitro-Chinolin erhalten wurde [23]).

Die Reduzierung von 5-Amino-chinolin erfolgte durch katalytische Hydrierung:

10 g 5-Nitro-chinolin wurden in 25 ccm Methanol gelöst und mit 1,6 g 2-proc.-Palladium-Tierkohle und Wasserstoff geschüttelt. Nach 30 Stunden hatte die Lösung 4,2 l Wasserstoff aufgenommen, also etwa die berechnete Menge. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum unter Wasserstoff abgedampft. Um die letzten Reste des Methanols zu entfernen, wurde der Rückstand mit Wasser angefeuchtet und nochmals eingedampft. Der Rückstand bestand aus 7,8 g fast reinem 5-Amino-chinolin in Form eines rötlichen Kristallkuchens.

23) W. Meigen, J. pr. (2) 77, 473 (1908).

6,6 (2',3'-Pyridino)-dioxindol-carbonsäure-äthylester.

Die Synthese führte nur dann zu einem kristallinen Produkt, wenn der verwendete Ester absolut rein, vor allem frei von Spuren nitroser Gase war, die ihm von der Darstellung her leicht anhaften. Es wurde daher stets das kristalline Hydrat (Dioxy-malonsäure-diäthylester) zur Anwendung gebracht, das durch Umkristallisieren leicht zu reinigen war. Die Darstellung des Mesoxalsäure-diäthylesters erfolgte nach einer Vorschrift von R. S. Curtiss[24]).

1,44 g 5-Amino-chinolin und 1,9 g Dioxy-malonsäure-diäthylester wurden in 25 ccm Eisessig gelöst und 20 Minuten zum Sieden erhitzt. Dann ließ ich abkühlen, verdünnte mit Wasser auf das doppelte Volumen und neutralisierte mit konz. Ammoniumcarbonatlösung. Nach 24stündigem Stehen konnte ein gelbgefärbter, körniger Niederschlag abfiltriert werden.
Rohausbeute: 2 g.

Aus diesem ließ sich durch Umkristallisieren aus Methanol unter Zusatz von aktiver Kohle 0,9 g reine Substanz erhalten.

Bei der Schmelzpunktsprobe zersetzte sich die Substanz gegen 200° ohne zu schmelzen. Ähnlich verhielten sich auch die anderen hier beschriebenen Chinolinderivate.
5,30 mg Substanz: 11,90 mg CO_2, 2,41 mg H_2O. —
6,82 mg Substanz: 0,593 ccm N_2 (16°, 756 mm).
C_{14} H_{12} O_4 N_2 Ber. C 61,74 H 4,45 N 10,30
Gef. C 61,25 H 5,07 N 10,22.

6,7—(2',3'-Pyridino)-isatin.

1,4 g Dioxindol-carbonsäure-äthylester wurden in 28 ccm 3,3%iger Natronlauge gelöst und auf dem siedenden Wasserbad unter Durchleiten von Luft erwärmt. Dabei färbte sich die Lösung dunkel und hellte sich wieder auf. Durch Neutralisieren mit verdünnter Salzsäure fiel das Isatin z. T. kristallisiert, gemischt mit seinem Chlorhydrat als oranger Niederschlag aus.
Ausbeute: 1,2 g.

Zur Darstellung des reinen Chlorhydrates löste ich das Isatin in wenig heißer konz. Salzsäure, aus der es beim Abkühlen in orange-roten Nadeln auskristallisierte. Diese wurden auf einer Glassinternutsche abgesaugt und mit Methanol gewaschen.
4,91 mg Substanz: 10,10 mg CO_2, 1,50 mg H_2O. —

24) Am. 35, 478 (1906).

5,87 mg Substanz: 0,609 N_2 (19°, 749 mm).
C_{11} H_7 O_2 N_2 Cl Ber. C 56,31 H 3,01 N 11,95
Gef. C 55,98 H 3,41 N 11,94.

6,7 — (2',3'-Pyridino)-isatin-oxim.

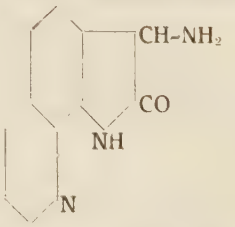
0,5 g Pyridino-isatin wurden in heißem Eisessig gelöst und mit 0,45 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,8 g Natriumacetat versetzt. Nach 1stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad konnte das Isatoxim durch Zugabe von Natriumacetat z. T. ausgefällt werden. Vollständig schied es sich ab durch Verdünnung mit Wasser.
Ausbeute: 0,25 g.

Das Rohprodukt war noch ein Gemisch von freier Base und dessen Acetat. Es wurde zur Analyse in das Perchlorat übergeführt. Eine möglichst konzentrierte Lösung des Oxims in Eisessig wurde mit 30%iger Perchlorsäure versetzt und dann abgekühlt. Das Perchlorat fiel nach einiger Zeit in kleinen, gelben Prismen aus.
5,47 mg Substanz: 0,627 ccm N_2 (18°, 765 mm).
C_{11} H_8 O_6 N_3 Cl Ber. N 13,40 Gef. N 13,53.

6,7- (2',3'-Pyridino)-3-amino-oxindol-dichlorhydrat.

0,1 g Oxim wurde in Eisessig mit 0,1 g 2%iger Palladium-Tierkohle hydriert. Die Wasserstoffaufnahme betrug: 27 ccm H_2, etwa die berechnete Menge. Nach Beendigung der Hydrierung wurde sofort in 3 ccm Eisessig filtriert, der mit Salzsäuregas gesättigt war. Es fiel das amorphe, hellgelbe Dichlorhydrat des Amino-oxindols aus, das wegen seiner Zersetzlichkeit nicht gereinigt werden konnte.
4,26 mg Substanz: 0,534 ccm N_2 (18°, 759 mm).
C_{11} H_{11} O N_3 Cl_2 Ber. N 15,44 Gef. N 14,39.
A. W. $_{37}$: 0,15.

3) 7,6-(2',3'-Pyridino)-3-Amino-oxindol.



Das benötigte 8-Amino-chinolin ließ sich darstellen nach den Angaben von R. P. Dikshoorn[25]) durch Reduktion von 8-Nitro-chinolin[26]) mit Eisenpulver in essigsaurer Lösung.

25) Rec. 48, 147 (1929).
26) l. c.

7,6-(2',3'-Pyridino)-dioxindol-carbonsäure-äthylester.

1,44 g 8-Amino-chinolin und 1,9 g Dioxy-malonsäure-diäthylester wurden in 15 ccm Eisessig gelöst und 15 Min. auf 70° erwärmt. Die Lösung wurde mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und mit konzentrierter Ammoniumkarbonatlösung schwach alkalisch gemacht. Nachdem der gelbbraune Niederschlag körnig geworden war, wurde er abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 2,2 g.

Durch Umkristallisieren aus Methanol unter Zugabe von aktiver Kohle konnte ein schwach-gelbliches Kristallpulver erhalten werden.

4,81 mg Substanz: 10,82 mg CO_2, 2,05 mg H_2O. —
6,77 mg Substanz: 0,615 ccm N_2, (18°, 775 mm).
C_{14} H_{12} O_4 N_2 Ber. C 61,74 H 4,45 N 10,30
Gef. C 61,35 H 4,77 N 10,37.

7,6-(2'3'-Pyridino)-isatin.

0,6 g Pyridino-dioxindol-carbonsäure-äthylester wurden in 15 ccm 2,5%iger Natronlauge gelöst und unter Durchleiten von Luft auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, bis die dunkelbraune Farbe der Lösung in gelbbraun umgeschlagen war. Aus der abgekühlten Lösung ließ sich das Isatin durch Zusatz von verdünnter Salzsäure bis zur schwachsauren Reaktion ausfällen. Der Niederschlag war teils amorph, teils kristallin. Durch Umkristallisieren aus Methanol mit aktiver Kohle ergaben sich hellrote Nädelchen.

5,08 mg Substanz: 12,40 mg CO_2, 1,48 mg H_2O. —
5,06 mg Substanz: 0,713 ccm N_2 (18°, 763 mm).
C_{11} H_6 O_2 N_2 Ber. C 66,65 H 3,05 N 14,15
Gef. C 66,57 H 3,26 N 14,08.

7,6-(2',3'-Pyridino)-isatin-oxim.

Die Darstellung ist die gleiche wie für das Isomere. Das Oxim kristallisierte aus verdünntem Eisessig in gelben, büschelförmigen Nadeln. Diese beginnen bei etwa 250° sich dunkel zu färben und gegen 265° unter Zersetzung zu schmelzen.

6,14 mg Substanz: 1,034 ccm N_2 (19°, 753 mm).
C_{11} H_7 O_2 N_3 Ber. N 19,51 Gef. N 19,71.

7,6-(2',3'-Pyridino)-3-amino-oxindol-dichlorhydrat.

Das Oxim wurde unter den gleichen Bedingungen wie das Isomere katalytisch hydriert. Das Dichlorhydrat fiel als hellgelber, amorpher Niederschlag aus, der sich an der Luft schnell grau-grün färbte. Eine Reinigung war auch hier wegen der

großen Zersetzlichkeit nicht möglich.
5,40 mg Substanz: 0,675 ccm N_2 (19°, 768 mm).
C_{11} H_{11} O N_3 Cl_2 Ber. N 15,44 Gef. N 14,44.
A. W. $_{37}$: 0,17.

Im Anschluß hieran mögen noch einige Substanzen beschrieben werden, die bei vergeblichen Versuchen die oben beschriebenen Isatine nach anderen Methoden darzustellen, erhalten wurden.

p-Toluolsulf-8-amino-chinolin.

0,96 g 8-amino-chinolin und 1,44 g p-Toluolsulfo-chlorid wurden in 13 ccm Pyridin gelöst und 12 Stunden auf 40° erwärmt. Nach Zusatz von verdünnter Salzsäure schied sich aus der Lösung ein Kristallbrei ab.
Ausbeute: 2,1 g.

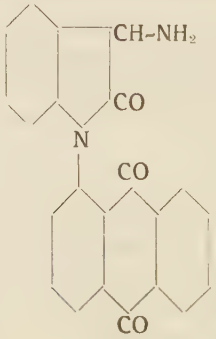
Aus verdünntem Methylalkohol umkristallisiert, ergaben sich farblose Nadeln. Smp. 154°.
6,53 mg Substanz: 0,553 ccm N_2 (19°, 751 mm).
C_{16} H_{14} O_2 N_2 S Ber. N 9,40 Gef. 9,57.

Wurde die Substanz in Alkohol gelöst und mit alkoholischer Natronlauge versetzt, so schied sich das Natriumsalz in farblosen Nadeln aus.

(8-Chinolyl)-oxamid.

1,44 g 8-Amino-chinolin wurden in 1,46 g Oxalsäurediäthylester gelöst und 1 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Zusatz von einigen ccm 90%igen Alkohols, schieden sich 2,1 g des Esters aus. (Smp. 90—91°). Die erhaltene Substanz wurde in Methanol gelöst und diese Lösung unter Eiskühlung mit Ammoniak gesättigt. Nach einigem Stehen schied sich das Amid in farblosen Kristallen ab. Smp. 222°.
7,13 mg Substanz: 1,22 ccm N_2 (18°, 750 mm).
C_{11} H_9 O_2 N_3 Ber. N 19,53 Gef. N 19,57.

4) N-Anthrachinonyl-3-amino-oxindol.



Ausgangssubstanz war Anthrachinon, das durch Sulfurierung nach einer Methode von R. Schmidt[27]) in α-Anthrachinonsulfosäure übergeführt wurde. Die Darstellung von α-Chor-anthrachinon aus α-Anthrachinonsulfosäure ging glatt nach einer Vorschrift von F. Ullmann und P. Ochsner[28]).

α-Phenyl-amino-anthrachinon konnte aus α-Chloranthrachinon und Anilin nach Angaben von F. Ullmann und O. Fodor[29]) erhalten werden.

N-Anthrachinonyl-isatin.

6 g α-Phenyl-amino-anthrachinon und 10 g Oxalylchlorid wurden in 70 ccm Nitrobenzol 6 Stunden auf 100° und anschließend 2 Stunden auf 150° erwärmt. Nach längerem Stehen konnte ein rotbrauner Niederschlag abfiltriert werden. Die Reinigung des Rohproduktes zur Weiterverarbeitung erfolgte durch Erwärmen in ca. 100 ccm Eisessig, in dem die gebildeten Nebenprodukte leicht löslich sind, während das Isatin darin schwer löslich ist.

Ausbeute: 2,5 g Isotin.

Für die Analyse und Konstitutionsbestimmung wurde das Isatin aus viel Eisessig umkristallisiert. Die rotbraunen Kristalle schmolzen bei 319°.

5,75 mg Substanz: 15,73 mg CO_2, 1,66 mg H_2O. —
7,20 mg Substanz: 0,241 ccm N_2 (18,5°, 761 mm).
C_{22} H_{11} O_4 N Ber. C 74,77 H 3,14 N 3,96
Gef. C 74,61 H 3,23 N 3,92.

Konstitutionsbestimmung:

0,8 g Isatin wurden in 10 ccm 10%iger Natronlauge gelöst, mit Wasser auf ca. 1000 ccm verdünnt und nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd während 8 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Ansäuern der Lösung mit verdünnter Salzsäure fiel ein roter Niederschlag aus, der in Eisessig umkristallisiert wurde. Die erhaltenen Kristalle schmolzen bei 281°. Die Mischschmelzpunktsprobe mit Anthrachinonyl-anthranilsäure ergab keine Depression.

N-Anthrachinonyl-isatin-oxim.

Die Gewinnung des Oxims geschah in üblicher Weise, indem 0,15 g Isatin in Eisessig mit Hydroxylaminchlorhydrat und Natriumacetat eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt wurde Es bildete sich hierbei ein Monoxim. Durch Verdünnen mit Wasser fiel das Oxim in hellgelben Nädelchen aus.

Ausbeute: 0,12 g.

27) B. 37, 67 (1904).
28) An. 381, 2 (1911).
29) An. 380, 322 (1911).

Das Oxim wurde aus Eisessig unter Zusatz von aktiver Kohle umkristallisiert.
Schmelzpunkt: Von 280° an Zersetzung unter Schwärzung der Substanz, bei 300° noch nicht geschmolzen.
5,92 mg Substanz: 15,6 mg CO_2, 1,85 mg H_2O. —
6,55 mg Substanz: 0,431 ccm N_2 (19°, 760 mm).
C_{22} H_{12} O_4 N_2 Ber. C 71,74 H 3,29 N 7,61
Gef. C 71,87 H 3,42 N 7,69.

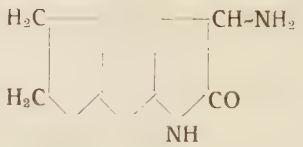
N-Anthrachinonyl-3-amino-oxindol-chlorhydrat.

0,2 g Oxim wurden in Eisessig gelöst und mit 0,9 g Zinn-II-Chlorid und 1,8 ccm konz. Salzsäure versetzt. Nach einstündigem Erhitzen auf dem Wasserbad wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und das Zinn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff ausgefällt. Die filtrierte Lösung hinterließ, im Vakuum unter CO_2-Schutz eingedampft, einen krustigen Rückstand. Aus diesem konnte das Pikrat nur als amorpher, gelber Niederschlag erhalten werden.

Schmelzpunkt: Von 110° an schwärzliche Färbung, bei **175° Schmelzen unter Zersetzung.**

Die erhaltene Substanz konnte wegen ihrer Zersetzlichkeit nicht gereinigt werden.
6,12 mg Substanz: 0,601 ccm N_2 (19°, 762 mm).
C_{28} H_{17} O_9 N_5 Ber. N 12,35 Gef. N 11,51.
A. W.$_{37}$: 0,27.
A. W.$_{37}$ von gleichzeitig gemessenem 6,7-Benzo-3-amino-oxindol: 0,59.

5) Acenaphten-3-amino-oxindol.



α-Amino-acenaphten:

5 g α-Nitro-acenaphten[30]) wurden in 25 ccm Methanol verteilt und mit 0,8 g 2%iger Palladium-Tierkohle in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme war nach 2 Tagen beendet und betrug: 2 l, etwa die berechnete Menge. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat mit soviel

30) C. Graebe, An. 327, 81 (1903).

Wasser verdünnt, daß das ausgefallene Amino-acenaphten sich beim Erwärmen wieder löste. Beim Erkalten schied es sich in gelben Nadeln ab, die einen Schmelzpunkt von 108° zeigten. Ausbeute: 3 g.

Acenaphten-dioxindol-carbonsäure-äthylester.

1,2 g α-Amino-acenaphten und 1,6 g Mesoxalsäure-diäthylester wurden in 6,5 ccm Eisessig gelöst. Die Kondensation trat unter leichter Wärmeentwicklung ein. Zum Schluß der Reaktion wurde die Lösung etwas auf dem Wasserbad angewärmt. Das Kondensationsprodukt schied sich als rötlicher Kristallbrei ab, der abgesaugt und mit Äther gewaschen wurde.
Ausbeute: 1,7 g, d. h. 82% der Theorie.

Das Rohprodukt wurde aus Eisessig mit aktiver Kohle umkristallisiert. Die Substanz kristallisierte in weißen Plättchen.
Schmelzpunkt: von 213° an setzte Verkohlung ein.
5,33 mg Substanz: 13,37 mg CO_2, 2,31 mg H_2O. —
6,42 mg Substanz: 0,267 ccm N_2 (21°, 763 mm).
C_{17} H_{15} O_4 N Ber. C 68,68 H 5,09 N 4,72
Gef. C 68,41 H 4,87 N 4,84.

Acenaphten-isatin.

1,7 g Acenaphten-dioxindol-carbonsäure-äthylester wurden in 7 ccm 33%iger Natronlauge gelöst und auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, bis die dunkel-grünliche Farbe der Lösung in goldgelb umschlug. Nach Ansäuern mit verdünnter Salzsäure fiel zuerst ein gelblicher Niederschlag aus, der unter Schäumen in eine dunkelbraune, kristalline Form überging.
Ausbeute: 1,1 g, d. h. 86% der Theorie.

Aus Eisessig kristallisierte die Substanz in rotbraunen Nadeln.
Schmelzpunkt: von 260° an Zersetzung.
5,84 mg Substanz: 16,12 mg CO_2, 2,33 mg H_2O. —
5,70 mg Substanz: 0,309 ccm N_2 (17°, 746 mm).
C_{14} H_9 O_2 N Ber. C 75,31 H 4,07 N 6,26
Gef. C 75,01 H 4,45 N 6,28.

Acenaphten-isatin-oxim.

1,1 g ungereinigtes Isatin wurden in Eisessig gelöst und mit Tierkohle aufgekocht. Die filtrierte Lösung wurde mit 0,7 g Hydroxylaminchlorhydrat und 3,4 g Natriumacetat versetzt. Nach einstündigem Erwärmen auf dem Wasserbad schied sich das Oxim kristallin aus. Der abfiltrierte Niederschlag wurde erst mit Eisessig und dann mit Wasser gewaschen.
Ausbeute: 0,8 g.

Schmelzpunkt: Von 235° an Zersetzung.

Aus Eisessig kristallisierte das Oxim in orange-roten, kleinen Drusen.

5,67 mg Substanz: 14,61 mg CO_2, 2,29 mg H_2O. —
6,03 mg Substanz: 0,596 ccm N_2 (19°, 764 mm).
C_{14} H_{10} O_2 N_2 Ber. C 70,57 H 4,23 N 11,77
Gef. C 70,28 H 4,51 N 11,62.

Acenaphten-3-amino-oxindol-chlorhydrat.

0,1 g Oxim wurden in 15 ccm Eisessig suspendiert und mit 0,3 g Zinn-2-chlorid und 1 ccm konz. Salzsäure versetzt. Beim Erwärmen auf dem Wasserbad schied sich das Chlorhydrat in silbergrauen, glänzenden Blättchen ab. Das abfiltrierte Chlorhydrat wurde mit viel Eisessig und einige Male mit Äther gewaschen. Ausbeute: 0,06 g.

Schmelzpunkt: von 260° an Zersetzung.

4,58 mg Substanz: 10,73 mg CO_2, 2,25 mg H_2O. —
4,93 mg Substanz: 0,444 ccm N_2 (19°, 759 mm).
C_{14} H_{13} O N_2 Cl Ber. C 64,23 H 5,38 N 10,71
Gef. C 64,09 H 5,50 N 10,54.

A. $W._{37}$: 0,54.
A. $W._{37}$ des gleichzeitig gemessenen 6,7-Benzo-3-amino-oxindol: 0,45.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Langenbeck, der mir das Thema dieser Arbeit stellte, schulde ich für sein Interesse und die rege Förderung meiner Untersuchungen großen Dank.

Ebenso bin ich Herrn Geh.-Reg.-Rat Prof. Dr. R. Schenck, in dessen Institut die Arbeit ausgeführt wurde, zu besonderem Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF.

Am 27. März 1907 wurde ich zu Düsseldorf als Sohn des Stadtoberinspektors Franz Hellrung geboren. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule kam ich auf die städtische Mittelschule, die ich Ostern 1922 mit dem Zeugnis der mittleren Reife verließ. Dann nahm ich eine Lehrstelle an bei der Firma Dr. Westhoff G. m. b. H., Düsseldorf, Laboratorium für Gießereiberatung, wo ich nach Beendigung der Lehrzeit von Herbst 1924 bis Herbst 1927 als Laborant tätig war. Die Reifeprüfung bestand ich Ostern 1927 als Externer an der Oberrealschule zu Bonn. Vom S.-S. 1927 bis S.-S. 1930 war ich als Studierender der Universität Köln eingeschrieben. Dort bestand ich am 7. Juli 1930 das erste Verbandsexamen für Chemiker. Im W.-S. 1930 ließ ich mich hier an der Universität Münster immatrikulieren, wo ich ununterbrochen bis heute geblieben bin. Nach Ablegung des zweiten Verbandsexamens am 24. 6. 1931 begann ich meine Doktorarbeit bei Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Langenbeck.